

Monascus purpureus の核酸分解酵素 (第1報)

培養液に存在する2種類の核酸分解酵素の性質と両酵素の活性測定法

添田栄一・村田 晃・猿野琳次郎

(発酵生産学研究室)

昭和46年10月21日 受理

Nucleolytic Enzymes of *Monascus purpureus* (Part I)

Some Properties of Two Kinds of Nucleolytic Enzymes in the Fluid Culture and a Method for Measurement of Their Activities

Eiichi SOEDA Akira MURATA, and Rinjiro SARUNO

(Laboratory of Applied Microbiology)

Received October 21, 1971

Summary

1. From the fluid culture of *Monascus purpureus*, two enzymes with RNA-degrading activity were isolated and separated by a DEAE-cellulose column chromatography: One was a nuclease which, active on heat-denatured DNA and 3'-nucleotide in addition to RNA, hydrolyzed RNA to 5'-nucleotides with a pH optimum of 5.3. The other was a RNase which hydrolyzed RNA to 3'-nucleotides with a pH optimum of 4.5.

2. The nuclease was more heat-resistant than the RNase, and the former was optimally active at 70°C and the latter at 55°C.

3. A method was established for measuring the nuclease and the RNase activities in the fluid culture; where C_{40} and C_{70} were RNA-degrading activities of the fluid culture at 40°C and 70°C, respectively.

The nuclease activity: $1.05 (C_{70} - 0.10 C_{40})$

The RNase activity: $1.05 (C_{40} - 0.49 C_{70})$

4. Both the nuclease and the RNase activities were inhibited by several heavy metals.

緒 言

微生物の細胞外加水分解酵素の役割の1つは、細胞外の資化性物質を細胞内に摂取できる形態に水解することであろう。したがって、その存否はきわめて生物学的合目的性を持つものと考えられる。

Monascus purpureus は菌体外に2種類の核酸分解酵素、すなわち、RNAを分解し5'-ヌクレオチドにする酵素(ヌクレアーゼ)と3'-ヌクレオチドにする酵素(RNase)を持つ。このように相異なる作用様式を持つ核酸分解酵素の生物学的役割が同一か否かは興味ある問題である。なかんずく、これらの酵素が、培養条件の変化にいかに対応するかを調べることは、その役割解明への一手段

となるであろう。しかしながら、そのためには両者が同時に存在する培養液中の各々の活性を測定できる方法を確立する必要がある。本報告では *Monascus purpureus* の培養液中に存在する2種類の核酸分解酵素、すなわちヌクレアーゼと RNase を分離精製し、その酵素的性質を明らかにするとともに、各々の酵素たん白質の特徴を利用することによって、培養液中の各々の活性値を知る簡便な測定法について検討した結果について述べる。

実験材料および方法

使用試薬 2', (3')-ヌクレオチド, 5'-ヌクレオチド, RNA はいずれも興人パルプ社製である。なお, RNA は, Sevag らの方法¹⁾ にしたがって除蛋白を行った。3'-アデニル酸は Sigma 社製である。

使用菌株と培養液の調製 馬れいしょ寒天培地 (日本栄養化学社製) 上で保存した *Monascus purpureus* を使用した。3% フスマ, 0.1% NaCl, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% KNO_3 , 3% グルコースから成る培地 100 ml を, 500 ml の三角フラスコに入れ殺菌した。菌を接種し, 30°C で4日間, 回転振とう培養した。培養液をガーゼで絞り, そのろ液を遠心分離 (2500 r.p.m, 10分間) した後その上澄液をとり, 粗酵素液とした。

酵素活性測定法 ヌクレアーゼおよび RNase 活性測定法は, 基本的には Takahashi の方法²⁾ に従った。すなわち, 適当に希釈した酵素液 0.2 ml, 0.5 M 酢酸ソーダ緩衝液 (pH 5.3) 0.2 ml 脱イオン水 0.35 ml を 37°C に5分間保温した後に, 1.2% RNA 溶液 0.25 ml を加えた。37°C で15分間反応した後に, 0.75% 酢酸ウラニウムを含む25% 過塩素酸 0.2 ml を加え反応を停止した。室温で30分間放置し, 遠心分離 (2500 r.p.m, 10分間) した後上澄液 0.2 ml をとり脱イオン水で 5 ml に希釈した。続いて吸光度 260 m μ を測定し, ブランクの吸光度との差を酵素活性値とした。なお, ブランクは上記と同じ操作を行なうが, 酵素液は酢酸ウラニウム過塩素酸混液を加えた後に入れた。また, 反応温度は 37°C の他に 40°C および 70°C も使用した。

DNase 活性測定の際の基質には, Kay らの方法⁴⁾ により仔牛胸腺より調製した DNA を溶かし 0.4% 溶液にした。この溶液を沸とう水に15分間浸した後に水で急冷したものを使用した。DNase 活性測定法は, 基質としてこの熱変性 DNA を使用する以外は RNase 活性測定法と同じである。

3'-ヌクレオチダーゼ活性は, 3'-アデニル酸を基質として酵素反応を行なった後に遊離した無機リン酸を測定することにより決定した。すなわち, 適当に希釈した酵素液 0.1 ml, 0.5 M 酢酸ソーダ緩衝液 (pH 5.3) 0.1 ml, 脱イオン水 0.1 ml を 37°C で5分間保温した後に, 10 mM 3'-アデニル酸を 0.2 ml 加え反応を開始した。37°C で15分間反応した後に M 過塩素酸を 0.2 ml 加え反応を停止した。反応の結果遊離した無機リン酸は, Fiske, Subbarow の方法³⁾ に従って発色させ, 吸光度 700 m μ を測定することにより定量し, これを酵素活性とした。

酵素単位と全酵素活性 1 酵素単位とは, 上記の測定法により得られた活性値を酵素の希釈率で補正したときの値が1を示すとき1 酵素単位と定義した。全酵素活性として試料の量 (ml) と酵素単位との積を採用した。

たん白質の定量 たん白質濃度は, 試料の吸光度 280 m μ を測定することにより得た。

酵素分解物の同定 酵素作用によって得た RNA 分解物は塩酸で pH2 に調節し, 37°C で2時間保温した後にペーパークロマトグラフィーを行ない同定した。すなわち, 200 γ の RNA 分解物を東洋口紙 No 51 A にスポットした後に, 95% エタノール:2% (wt./vol.) 硼酸:濃アンモニ

ア (7:2:1)⁵⁾ を用い下降法で 20 時間展開した. ロ紙を風乾した後にマナスライトを照射し分離した RNA 分解物のスポットを検出した. そして, 同時にスポットしたマーカーの *Rf* 値と比較することにより分解物のスポットを同定した.

培養液の酵素の分離と部分精製 Peterson らの方法⁶⁾ により精製した DEAE-セルロース (Brown 社製 0.40 meq/g) を直径 0.8 cm, 長さ 25 cm のカラムにつめ, 0.01 M 酢酸ソーダ緩衝液 (pH6.0) で平衡化した. 続いて, 同緩衝液で透析した 23 ml の培養液を樹脂に吸着させた後に, 水平に置いた 2 つの同型の三角フラスコ的一方に 0.01 M 酢酸ソーダ緩衝液 (pH 6.0) 100 ml を, 他方に同緩衝液を含む 0.3 M NaCl 溶液をサイフォンで連絡し, 直線状に塩濃度を上げながら 1 時間に 10 ml の割合で溶出を行なった. 溶出液は 5 ml ずつ分取した.

結果および考察

静止期初期にある *Monascus purpureus* のフスマ液体培地を透析し, DEAE-セルロース・カラムに吸着させた. 続いて NaCl 濃度を直線状に上げながら溶出を行なうと, Fig. 1 に示すクロマトグラムを得た. RNA 分解活性は 2 つの分画を示したが, このうち最初に溶出したピークは RNA 分解活性の他に熱変性 DNA, 3'-アデニル酸分解活性も併せ示し, しかもそれら相互の活性は一定の比率をもって溶出されることがわかった. このように 3 つの基質に対する分解活性が, カラ

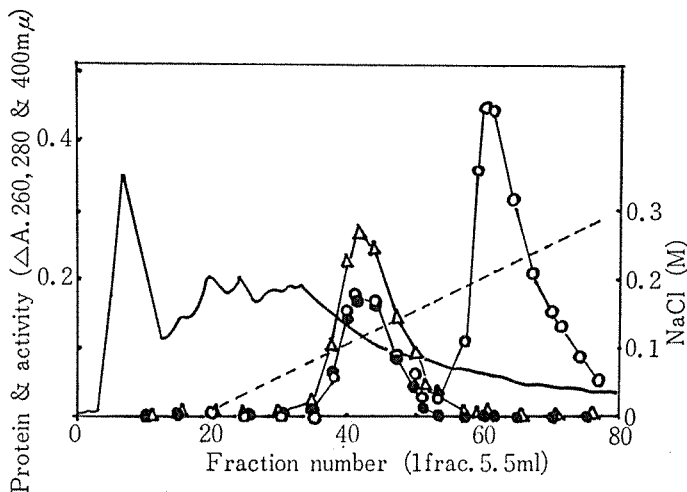


Fig. 1. Separation of the nuclease and the RNase by the DEAE-cellulose column chromatography

After dialyzed against 0.01 M sodium acetate buffer (pH 6.0), aliquots of 23 ml of the fluid culture were applied to a DEAE-cellulose column (0.8×25 cm) which had been previously equilibrated with 0.01 M sodium acetate buffer (pH 6.0), and then subjected to an elution by a linear gradient of NaCl from 0 to 0.4 M in the presence of the equilibrated buffer. Total volume was 400 ml and fraction of 5.5 ml was collected.

- ; protein (measured absorbance at 280 mμ)
- ; nuclease (used heat-denatured DNA as substrate)
- ; RNase (used RNA as substrate)
- △——△; non-specific acid phosphatase (used 3'-adenylic acid as substrate)
- ; molarity of NaCl

ムクロマトグラフィーにより同一の場所に溶出されることは、*Penicillium citrinum* の固型培地中の酵素ではすでに報告^{7,8)} されている。3つの分解活性が同一酵素たん白に由来するか否か確かめるために、この酵素画分を取りさらに精製し検討中であるが、今のところ 3000 倍程度の精製度でもこの酵素画分は3つの基質に対する一定の分解活性比を維持していることがわかった。したがって、ここではこの画分をスクレアーゼと名づけておく。また、NaCl 濃度が 0.2 M 付近で溶出するピークは、RNA 分解活性だけを示したのでこの画分は RNase と名づける。培養液中のスクレアーゼと RNase の活性の比は菌の培養時間に関係する。すなわち、静止期以後長時間培養した菌の培養液を DEAE-セルロースに吸着させ、同じ操作により溶出を行なうと、スクレアーゼのピークはほとんど消失し RNase のピークしか現われなかった。この2つの酵素による RNA 分解物を塩酸で pH 2 にし、37°C で 2 時間保温した後にペーパークロマトグラフィーを行なった。Fig. 2 に示すように、スクレアーゼによる RNA 分解物のスポットは、ことごとくマーカーの 5'-スクレオチドの R_f 値と一致した。さらに原点には RNA の吸収がほとんど認められなかったことにより、本酵素は RNA を全て 5'-スクレオチドに分解したといえる。一方、RNase による RNA 分解物のスポットは、同時に吸着し展開を行なったマーカーの 2'-(3')-スクレオチドの R_f 値とすべて一致した。ただし、RNase による分解物を塩酸処理を行わずにそのまま口紙に吸着させペーパークロマトグラフィーを行なうと、2'-(3')-スクレオチドに相当するスポットの他に R_f 値の高いスポットも検出できた。以上のことにより本菌の培養液中には、RNA の糖の 3' と 5' のリン酸結合を 3' 側で切断し 5'-スクレオチドをつくるスクレアーゼと、5' 側で切断し 3'-スクレオチドをつくる RNase という作用様式の相異なる2種類の核酸分解酵素が、同時に存在

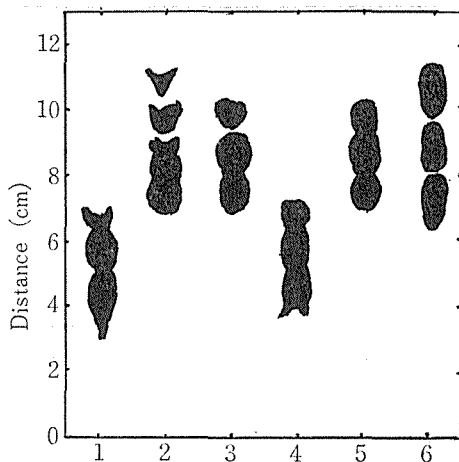


Fig. 2. Paper chromatography of the digestion products of RNA with the nuclease and the RNase

The nuclease and the RNase isolated by the DEAE-cellulose column chromatography were used. After RNA was digested with 4 unit of the enzyme, digestion products were treated with HCl and aliquots of 200 γ were applied to the filter paper of Toyo Roshi No. 51 A and run descendingly with a mixture of 95% ethanol, 3% (wt/vol) boric acid and concentrated ammonia(7:2:1).

1: nuclease digest 2: RNase digest 3: HCl-treated RNase digest 4: 5'-nucleotides 5: 3'-nucleotides 6: nucleosides

すると結論づけられる。なお、RNase の分解産物が塩酸処理により 2'-(3'-)ヌクレオチドに収められたことは、分解の中間産物として 2'-, 3'-サイクリックヌクレオチドの存在を示唆する。

次に両者が同時に存在する培養液中の各々の活性値を知る方法について検討した。その一方法として、一方の酵素による RNA 分解物の末端リン酸基に特異的に働くヌクレオチダーゼを作用させ、遊離した無機リン酸を測定することによりその酵素活性値を知る方法⁹⁾もあるが、すでに述べたように培養液中には強い 3'-ヌクレオチダーゼや非特異的ホスファターゼが存在するため、この方法は本菌の場合、適当でない。そこで実際に分離したヌクレアーゼと RNase の酵素

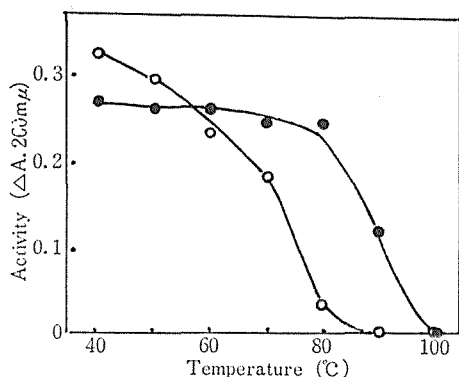


Fig. 3. Effect of heat on stabilities of the nuclease and the RNase

The nuclease and the RNase were incubated for 5 min at the temperatures indicated and rapidly cooled in an ice bath. The activity was measured by the standard assay procedure.

●—● : nuclease ○—○ : RNase

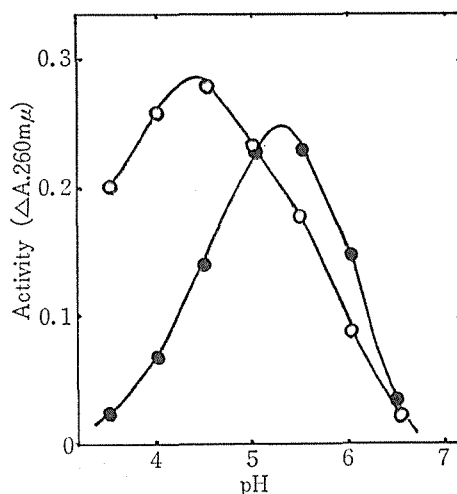


Fig. 4. PH-dependence of RNA-digesting activities of the nuclease and the RNase

The RNA-digesting activity was measured by the same standard assay procedure except that pH's of sodium acetate buffer were varied.

●—● : nuclease ○—○ : RNase

たん白の性質を調べ、その特徴を利用する他の活性測定法を求めた。

Fig. 3 は、DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーにより単離したヌクレアーゼと RNase 溶液を pH 6.0 にし 5 分間の熱処理した後に、37°C で RNA 分解活性を測定した結果を示す。図から明らかなように、ヌクレアーゼの方が熱に対して安定であった。特にヌクレアーゼは 80°C ではもとの活性を保持していたが、RNase の方はもとの活性の 15% に低下した。そこで 80°C の熱処理により RNase をほとんど失活させ、残るヌクレアーゼ活性を測定する方法を検討したが、図から予想されるように、ヌクレアーゼの失活が 80°C 以上では急激に起るので、厳密な条件下で熱処理を行なってもヌクレアーゼの活性値は一致せず、したがってこの方法は確立できなかった。

また、*Aspergillus oryzae* の RNase T_1 と T_2 の活性の区別に用いられた至適 pH の相違は、本菌の場合 Fig. 4 に示すように、ヌクレアーゼの至適 pH は 5.3, RNase のそれは pH 4.5 であり、pH 5.3 と 4.5 における活性の比はヌクレアーゼが 2:1, RNase が 2:3 で、あまり大きな差異は認められず、したがってこれを利用することは困難である。

一方、酵素活性と反応温度との関係は、Fig. 5 に示すように、両酵素の間にはかなりの差があり、RNase の至適温度は 52°C, ヌクレアーゼのそれは 70°C であった。特に至適温度における活性を 100 とした場合、40°C と 70°C におけるヌクレアーゼの活性の比は 7.5:100, RNase のそれは 49:9 であり、両者の間の相違は著しい。もし、培養液中にこの 2 つの核酸分解酵素のみしか存在せず、かつ各々が独立に RNA に作用すると仮定すれば、この比を利用し各々の酵素活性値を知ることができる。すなわち、培養液中のヌクレアーゼ、RNase および両者が混在する培養液の 40°C と 70°C における RNA 分解活性を、それぞれ A_{40} と A_{70} , B_{40} と B_{70} , C_{40} と C_{40} とすれば

$$C_{40} = A_{40} + B_{40}$$

$$C_{70} = A_{70} + B_{70}$$

今、 $A_{40}/A_{70} = x$, $B_{70}/B_{40} = y$ とし、 A_{40} , B_{70} を消去すれば、

$$A_{70} = \frac{C_{70} - y \cdot C_{40}}{1 - xy}$$

$$B_{40} = \frac{C_{40} - x \cdot C_{70}}{1 - xy}$$

Fig. 5 より、 $x = A_{40}/A_{70} = 0.11$, $y = B_{70}/B_{40} = 0.49$ したがって、

$$\left. \begin{aligned} A_{70} &= 1.05(C_{70} - 0.10 \times C_{40}) \\ B_{40} &= 1.05(C_{40} - 0.49 \times C_{70}) \end{aligned} \right\} \dots\dots\dots (1)$$

が得られる。つまり、40°C と 70°C における RNA 分解活性を測定することにより、40°C における RNase 活性と 70°C におけるヌクレアーゼ活性を知ることができる。ただし、一方の酵素活性が零と算出されたときは、他方の酵素活性は 40°C あるいは 70°C における活性値をそのまま酵素活性値とした。

Table I は、透析した培養液に本式を適用し得たヌクレアーゼと RNase の全酵素活性値と、DEAE-セルロースカラムを用い、この培養透析液の酵素を実際に分離した後に、70°C と 40°C

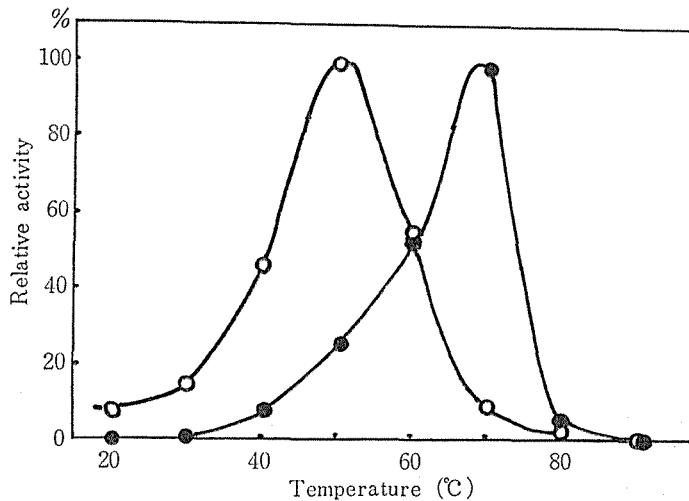


Fig. 5 Temperature-dependence of RNA-digesting activities of the nuclease and the RNase

The RNA-digesting activity was measured at the temperature indicated according to the standard assay procedure. The maximum activity of each enzyme was taken set as 100%.

●—● : nuclease ○—○ : RNase

Table I Comparison between total activities of the nuclease and the RNase in the fluid culture and those fractionated by the DEAE-cellulose column chromatography

	RNase	Nuclease
Fluid Culture ^{a)}	144	467
DEAE-cellulose Column ^{b)}	145	447

Reactions were carried out at 40°C and 70°C, as described in "Experimental Procedure".

a) calculated from the equation (I).

b) measured after fractionation by the DEAE-cellulose column chromatography, as shown in Fig. 1.

における両酵素の全酵素活性値を測定した結果とを比較した表である。酵素分離のクロマトグラムはすでに Fig. 1 に示しているが、この場合の RNA 分解活性は 37°C で測定したものである。フラクション 36~50 および 55~77 を集め、それぞれヌクレアーゼ画分と RNase 画分とし、それぞれ 70°C と 40°C における全酵素活性値を改めて求めた。なお本クロマトにおける酵素の回収率は 97% であった。そして表が示すように、透析した培養液に本式を適用し得たヌクレアーゼと RNase の全酵素活性値と、実際に酵素を分離した後に測定し得た全酵素活性値間には差は小さい。さらに、培養液に本式を適用し得た酵素単位と同じ酵素単位の分離精製したヌクレアーゼと RNase を混合した酵素液と、培養液の RNA 分解活性の至適温度の比較を Fig. 6 に示す。各温度において酵素混合液と培養液との活性の差はほとんどみられなかった。さらに培養液の活性のピークが 52°C と 70°C 付近にあることは、本条件下では培養液の RNA 分解活性に、ヌクレアーゼと RNase の 2 種類の酵素のみしか関与していないという証明にもなりうる。

Fig. 7 は、培養液に本式を適用し測定したヌクレアーゼと RNase 活性とそれらの酵素濃度と

の関係を示す。ヌクレアーゼは0から0.9酵素単位まで、RNaseは0から0.95酵素単位まで活性は酵素濃度に比例する。

Table II は、RNA 分解活性に及ぼす金属の影響を調べた結果を示す。なお酵素はカラムクロマトグラフィーにより分離したヌクレアーゼと RNase を使用した。両酵素を特に賦活化する金属は見つからなかったが、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ag^{+} 等の重金属は両酵素の活性を阻害した。

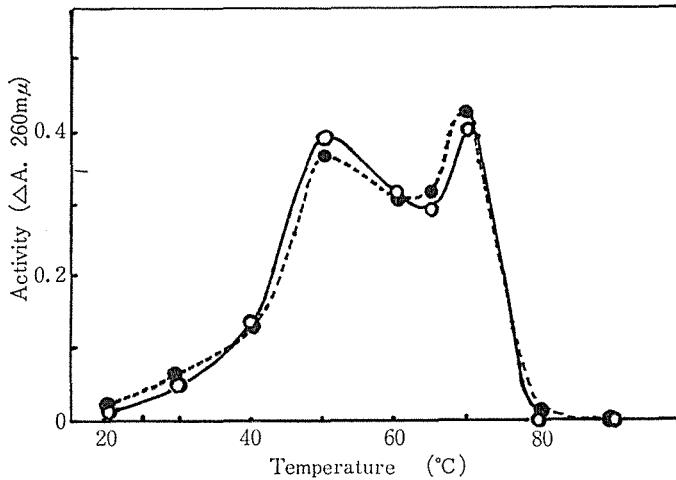


Fig. 6. Coincidence of RNA-digesting activities in the fluid culture and a mixture of the nuclease and the RNase at varying temperatures

The isolated nuclease and RNase were mixed so that their enzymatic units might be as same as those in the fluid culture which were calculated from the equation (I).

●-----● : fluid culture ○——○ : mixture

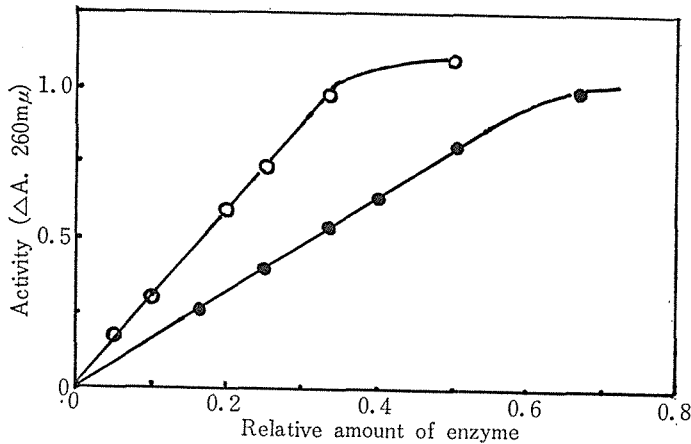


Fig. 7. Relationship between the amount of enzyme and RNA-digesting activity

Reactions were carried out at 40°C and 70°C using the fluid culture, as described under "Experimental Procedure".

The nuclease and the RNase activities were calculated from the equation (I).

●——● : Nuclease ○——○ : RNase

Table II Effect of metals on the RNA-digesting activity

Substance	Nuclease		RNase	
	%		%	
None	100		100	
EDTA	100		97	
KCl	115		97	
CaCl ₂	87		72	
MgCl ₂	104		87	
BaCl ₂	88		84	
MnCl ₂	90		82	
CuCl ₂	19		0	
FeCl ₂	52		10	
AgNO ₃	15		20	

Reactions were carried out at 37°C, using the isolated enzymes.
Metals were added at a concentration of 1×10^{-3} M.

摘 要

1. *Monascus purpureus* の液体培養液中には RNA を分解し 5'-スクレオチドにする酵素，ヌクレアーゼと，3'-スクレオチドにする酵素，RNase が存在する。両者は DEAE-カラムクロマトグラフィーにより分離できた。

2. ヌクレアーゼと RNase の至適 pH は，それぞれ 5.3 と 4.5 であり，前者は後者よりやや耐熱性であった。

3. ヌクレアーゼと RNase の 40°C と 70°C における RNA 分解活性の比を利用し，両者が混在する培養液中の活性値を得る簡便な測定法を求めた。すなわち，培養液の 40°C と 70°C における RNA 分解活性をそれぞれ C_{40} と C_{70} とすれば，70°C におけるヌクレアーゼの活性値と 40°C の RNase の活性値は次の式より算出することができる。

$$\text{ヌクレアーゼ} \quad 1.05 \times (C_{70} - 0.10 C_{40})$$

$$\text{RNase} \quad 1.05 \times (C_{40} - 0.49 C_{70})$$

さらにこの式を用いた 2 つの実験より，本法に誤りのないことを確かめた。

4. ヌクレアーゼと RNase 活性を顕著に賦活化する金属は見い出されなかったが，重金属はいずれの酵素活性をも著しく阻害した。

文 献

- 1) G. M. Sevag, D. B. Lackman, and J. Smolens: J. Biol. Chem., **124**, 425 (1938)
- 2) K. Takahashi: J. Biochem., **49**, (1961)
- 3) C. H. Fiske, and Y. Subbarow: J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925)
- 4) M. R. E. Kay, S. N. Simmons, and L. A. Dounce: J. Am. Chem. Soc., **74**, 1724 (1952)
- 5) D. B. Straus, and E. Goldwasser: J. Biol. Chem., **236**, 849 (1956)
- 6) 田中明, 藤島鉄郎, 藤本正雄, Amino Acid and Nucleic Acid 醗酵と代謝, **16**, 28 (1967)
- 7) M. Fujimoto, A. Kuninaka and H. Yoshino: Agr. Biol. Chem., **33**, 1517 (1969)
- 8) K. Ogata, S. Igarashi, E. Omura, Y. Sugino, M. Yoneda, and I. Suhara: Agr. Biol. Chem., **27**, 110 (1963)
- 9) T. Uchida: J. Biochem., **60**, (1966)